Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 3, Fall2021, p. 335-349

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰،ص۳۴۹-۳۳۵

مقاله علمی- پژوهشی

سطوح مختلف اسانس‌های میخک و مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری در تکنیک تولید گاز و تاثیرات ضدمیکروبی آنها بر باکتری پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس (*Peptostreptococcus anaerobius*) جداسازی شده از شکمبه

حجت ایمانی مقدم[۱]، سمانه قاسمی[۲]، سعید سبحانی راد[۳*]، مهدی بهگر[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۴

ایمانی مقدم، ح.، س. قاسمی، س. سبحانی راد، و م. بهگر. ۱۴۰۰. سطوح مختلف اسانس‌های میخک و مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری در تکنیک تولید گازو تاثیرات ضدمیکروبی آنها بر باکتری پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس(*Peptostreptococcus anaerobius*) جداسازی شده از شکمبه. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۳۴۹-۳۳۵.

چکیده

به‌منظور بررسی اثر مقادیر مختلف اسانس‌های میخک و مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری در شرایط برون‌تنی، دو آزمایش تولید گاز و کشت میکروبی طراحی‌گردید. تکنیک تولید گاز در قالب آزمایش فاکتوریل ۳×۳ شامل اسانس‌های مرزه و میخک هرکدام ۳ سطح (۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم) طراحی شد. مقدار تولید گاز در طی ساعات ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ اندازه‌گیری شد. سطوح بالای اسانس میخک در ساعات ابتدایی تخمیر باعث افزایش معنی‌دار گاز تولیدی گردید. در مقابل اسانس میخک در ساعات ۲۴-۸ تولید گاز را کاهش‌داد. در آزمایش میکروبی، سطوح مختلف اسانس‌های مرزه و میخک (۲۰، ۳۵ و ۴۰ میکرولیتر برای هر اسانس بصورت جداگانه) و همچنین سطوح ترکیبی اسانس‌های مزبور (۹ تیمار حاوی سطوح ترکیبی) و یک گروه شاهد (استرپتومایسین) مورد مقایسه قرار گرفتند. بعد از انجام کشت باکتری پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس در محیط کشت و تقابل آن با اسانس‌های مرزه و میخک مشاهده گردید تمامی تیمارهای حاوی اسانس (ساده و ترکیبی) نسبت به شاهد، تیمارهای حاوی اسانس مرزه نسبت به شاهد و سطوح ترکیبی اسانس‌های مزبور نسبت به سطوح ساده اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد این باکتری داشته‌است. به طور کلی نتایج مرحله اول آزمایش نشان داد که استفاده از اسانس میخک باعث کاهش تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری شد، اما اسانس مرزه بر مقدار تولید گاز، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و مقدار اسیدهای چرب فرار تأثیر نداشت. نتایج حاصل از آزمایشات کشت میکروبی نیز نشان داد اسانس‌های مرزه و میخک اثر ممانعت کنندگی بر رشد باکتری پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس داشته و در نتیجه تولید آمونیاک توسط این باکتری کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی:اسانس مرزه، اسانس میخک، اسیدهای چرب فرار، پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس، تولید گاز.

مقدمه

همزیستی بین میکروارگانیسم‌های شکمبه و حیوان سبب ایجاد شرایط و محیط مناسب تخمیر خوراک و محصولات میکروبی توسط میکروارگانیسم‌ها می شود. به هر حال، این همزیستی همراه با اتلاف انرژی به صورت متان و اتلاف پروتئین به صورت آمونیاک است (۷). در این راستا، متخصصین تغذیه نشخوارکنندگان به دنبال راهی جهت

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.
۲- استادیار دپارتمان کشاورزی، دانشکده فنی و کشاورزی شهریار، دانشگاه فنی و حرفه ای استان تهران، ایران.
۳- استادیار گروه علوم کشاورزی ، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.
۴- استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج، ایران.
(*- نویسنده مسئول:Email: sobhanirad@gmail.com)
DOI:10.22067/ijasr.v13i3.73987

بهبود راندمان انرژی و پروتئین در شـــکمبه از طریق تغییر در محیط شکمبه می‌باشند (۶). استفاده از افزودنی‌هایی مانند آنتی بیوتیک‌ها در کاهش اتلاف انرژی و پروتئین در شـــکمبه موفق بوده‌اند (۷)، اما در سال‌های اخیر نگرانی‌های عمومی در رابطه با استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها به دلیل شـــیوع مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها و انتقال آن‌ها از دام به انسان، افزایش یافته است. همچنین ممنوعیت استفاده از آنها در اتحادیه اروپا از سال ۲۰۰۶ باعث کاهش استفاده ازآنها شده اســت. به همین دلیل دانشــمندان به دنبال اســتفاده از مواد جایگزین جهت تغییر در تخمیر شــکمبه هســـتند که می‌توان به پروبیوتیک‌ها، مخمرها، اسیدهای آلی، عصاره و اسانس‌های گیاهی اشاره کرد (۶).

دامنه وسیعی از ترکیبات آلی توسط گیاهان تولید می شوند که به نظر می‌رسد تأثیر مستقیمی بر رشد آنها ندارد (۱). این ترکیبات معمولاً مســـئول بو، رنگ و طعم در گیاهان هســـتند و به عنوان ناقل‌های شیمیایی بین گیاه و محیط عمل می‌کنند و اغلب فعالیت ضدمیکروبی در مقابل باکتری‌ها، قارچها و مخمرها دارند (۱۵). فعالیت اسانس‌های گیاهی برعلیه باکتری‌ها، پروتوزوآها و قارچها به اثبات رسیده است، اما طرز عمل آنها دقیقا روشن نیست (۴ ، ۱۲ و ۱۵). چندین فرضیه جهت توصیف ویژگی‌های ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی بیان شده است. فرضیه ای که بیش از همه مورد پذیرش قرار گرفته است اثر متقابل اســانس‌های گیاهی برغشــای ســلول‌های باکتریایی اســت. تجمع اسانس‌های گیاهی بین زنجیره‌ها یا اسیدهای چرب موجب تغییرات ساختاری درغشای سلولی شده و موجب افزایش بی ثباتی و سیالیت غشـــا می‌گردد (۱۷). همچنین اســـانس‌های گیاهی ممکن اســـت باکتری‌های تولید کننده آمونیاک[1] زیاد مانند کلستریدیوم استیکلندی[2] و پپتواســـترپتوکوکوس انئروبیوس[3] در شـــکمبه را مهار نمایند. باکتری‌های تولید کننده آمونیاک زیاد به تعداد بالا در شـــکمبه وجود ندارند اما دارای فعالیت‌های دی آمیناسیون خیلی شدیدی می‌باشند و آمونیاک زیادی در شـــکمبه تولید می‌کنند (۳۲، ۳۶ و ۳۹). بنابراین کاهش باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک بالا می‌تواند موجب کاهش دی آمیناسیون اسیدهای آمینه، کاهش غلظت آمونیاک و افزایش بازده استفاده از پروتئین در شکمبه گردد (۳۹). باکتری پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس به صورت یک کوکسی غیرمتحرک گرم مثبت، که معمولا به شـکل منفرد یا دوتایی اسـت دیده می‌شـود، بی هوازی بوده و ۱ تا ۱/۲ میکرولیتر قطر دارد. این ارگانیســـم پکتین را به ســـرعت تخمیر می‌کند و بعنوان محصولات نهایی اصلی اسیداستیک و هیدروژن تولید می‌نماید. مقادیر کمی اســـید فرمیک در اثر تخمیر پکتین نیز تولید می شود. همچنین مشاهده شده است این باکتری به جز رشد خیلی آهسته و کمی که بر روی گلوکز، سلوبیوز، مالتوز و سوکروز دارد، بر روی منابع دیگر کربوهیدرات رشـدی در حد صـفر و یا خیلی کم دارد (۱۳).

در میان اســـانس‌های گیاهی موثر بر متابولیســـم میکروب‌های شکمبه و کاهش شدید غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه، اسانس های میخک و مرزه نیز عنوان شـــده‌اند (۵). اثرات ضـــد پروتوزوآیی عصاره میخک در مطالعات برون تنی با آزمایش تولید گاز اثبات شده است (۱۰). در این خصوص گزارش شده است که عصاره میخک با کاهش فعالیت پپتیدولیتیکی در شکمبه بر متابولیسم نیتروژن تاثیرگذار است (۵). همچنین اثرات عصاره میخک بر تخمیر شکمبه‌ای و کاهش اسیدهای چرب آزاد و نیتروژن آمونیاکی گزارش شده است (۷). گونل و همکاران (۱۸) نیز بیان کرده اند اوژنول (Eugenol) ترکیبی فنولی اســـت که بخش عمده ترکیبات موثر میخک را تشـــکیل می دهد و اثرات ضد میکروبی وسیعی بر باکتریهای گرم مثبت و منفی دارد (۱۸). در خصـــوص اثرات اســـانس مرزه، طلاتپه و همکاران (۳۸) اثر این اســـانس بر تخمیر شـــکمبه‌ای در بزها و کاهش نیتروژن آمونیاکی را گزارش نموده اند. حدود یک یا دو درصد گیاه مرزه را اسانس این گیاه تشکیل می‌دهد، از مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس می‌توان ازکارواکرول (۳۰ تا ۴۰ درصـد)، تیمول (۲۰ تا ۳۰ درصـد) و ترکیبات فنلی دیگر نام برد (۲۷).

مطالعات اندکی در مورد اثرات اســـانس میخک و به خصـــوص اسانس مرزه بر خصوصیات هضمی اقلام خوراکی در داخل کشور انجام شده است. همچنین در خصوص اثرات متقابل اسانس‌های مرزه و میخک در آزمایشـات برون تنی، مطالعه‌ای توسـط نگارندگان یافت نشد. بنابراین هدف از انجام این آزمایشت أثیر افزودن سطوح مختلف دو اســـانس میخک و مرزه بر فراســـنجه‌های تخمیری و اثرات ضـــد میکروبی آنها بر باکتری پپتواســـترپتوکوکوس انئروبیوس در آزمایش تولید گاز بود.

مواد و روش‌ها

اسانس‌گیری نمونه‌های گیاهی به روش کلوونجر[4]: از دو گیاه میخک ومرزه پس از شـناسـایی در آزمایشـگاه علوم زراعی دانشگاه آزاد مشهد مجتمع بین المللی گلبهار بوسیله دستگاه کلوونجر (شرکت فودس آلمان) اسانس‌گیری انجام شد. به منظور اسانس‌گیری، ابتدا نمونه خشک و سپس برای افزایش سطح تماس، آسیاب شد. پودر آسیاب شده دربالن ژوژه ریخته شد و پس از آن تا دو سوم حجم بالن با آب مقطر پر شـد. سـپس بالن ژوژه‌های حاوی مواد به دسـتگاه اسانس‌گیری کلوونجر متصل شدند.

1- Hayper Producing Bacteria
2- *Clostridium sticklandii*
3- *Peptostreptococcusanaerobius*
4- Clevenger

به منظورآغاز کار منبع حرارت روشن شده و زمان شروع آزمایش ثبت شد. اسانس به دلیل ترکیبات خود معمولاً دارای چگالی کمتر از آب اســت، به همین خاطر روی آب قرار می‌گیرد. در پایان عملیات اسانس‌گیری،شیرخروجی دستگاه کلوونجر باز شد و اسانس در ظرف مخصوص خود ریخته شد.

آماده ســازی نمونه‌ها و تیمارهای آزمایشــی: برای انجام آزمایش تولید گاز از مخلوط علف یونجه و دانه جو (نســبت ۱:۱) و اسانس‌های تهیه شده میخک و مرزه هر کدام با سه سطح (۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم) به صــورت طرح کاملاً تصــادفی در قالب آزمایش فاکتوریل ۳×۳ و در مجموع ۹ تیمار اسـتفاده شـد. علف یونجه و دانه جو از واحد گاوداری شیری تهیه شده بودند.

تهیه نمونه مایع شکمبه: مایع شـکمبه از دو رأس گوسـفند (۲/۵±۴۹/۵کیلوگرم وزن زنده) که دارای فیستولای شکمبه‌ای بودند قبل از وعده‌ی خوراک‌دهی صــبح گرفته شــد. حیوانات روزانه با یک کیلوگرم یونجه و ۰/۳ کیلوگرم کنسانتره (شامل دانه جو، کنجاله سویا، ســبوس، آهک، نمک و ممکل معدنی و ویتامینه) بر اســاس ماده‌ی خشک تغذیه می‌شدند. مایع شکمبه جمع آوری شده از گوسفندان به نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط و فوراً به و سیله پارچه متقال چهار لایه صاف شد و در فلاسک مخصوص به آزمایشگاه منتقل شد. سپس ظرف محتوی مایع شکمبه در آب گرم ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

آزمایش تولیدگاز: آزمایش تولید گاز بر اســاس روش منک و همکاران (۲۷) انجام شــد. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از مخلوط یونجه و جو (نسبت ۱:۱) به همراه ۹ تیمار آزمایشی (مقادیر مختلف اسانس میخک و یا مرزه) در سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی لیتری ریخته شد و به آن محیط کشت حاوی مایع شکمبه به میزان ۳۰ میلی‌لیتر اضافه شد و در حمام آب گرم ۳۹ درجه ســانتی گراد آنکوباســیون شــدند. مقدار تولید گاز در طی ســاعات ۲، ۴، ۶، ۸ ، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ اندازه‌گیری شد. برای تهیه محیط کشت از مایع شکمبه صاف شده، از پارچه متقال چهارلا اســتفاده شــد. ترکیب نهایی محیط کشــت (۵۰۰ میلی لیتر) به شرح زیر بود: آب مقطر ۲۳۷ میلی‌لیتر، محلول نمک‌های پرنیــاز ۱۱۸/۵میلی لیتر، محلول بــافر ۱۱۸/۵ میلی‌لیتر، محلول نمک‌های کم نیاز ۰/۰۶ میلی‌لیتر، رزوزارین ۰/۶۱ میلی لیتر، محلول احیاء کننده ۲۵ میلی‌لیتر (شــامل ۲۳/۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱ میلی‌لیتر ســود ۱ نرمال و ۱۴۲/۵ میلی‌گرم ســولفید ســدیم). همچنین ماده آلی قابل هضم (معادله ۱) و انرژی متابولیسمی (معادله ۲) بر اساس روش پیشـــنهادی منک و اســتینگاس (۲۶) و مقدار اســیدهای چرب کوتاه زنجیر (معادله ۳) در هر ســرنگ بر اســاس معادله ارائه شــده گتاچو و همکاران (۱۶) به صورت زیر تخمین زده شد:

پروتئین خام ۰/۰۸۱۵ + تولید گاز ۰/۷۲۲۲۲ + ۲۴/۹۱ = (در صد) ماده آلی قابل هضم (معادله۱)

^{2}(پروتئین خام) ۰/۰۰۰۲۸۵۹ + پروتئین خام ۰/۰۰۵۷ + تولید گاز ۰/۱۳۵۷ + ۲/۲ = (MJ/kg DM) انرژی متابولیسمی (معادله ۲)

۰/۰۰۴۲۵ – گاز تولیدی ۰/۰۲۲۲=(میلی مول به ازای ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک) اسیدهای چرب فرار (معادله ۳)

تهیه باکتریهای خالص شکمبه ای

برای فراهم کردن باکتری‌های شکمبه، بعد از گرفتن مایع شکمبه و صــاف کردن آن، در ۱۰۰۰ دور برای ۱۰ دقیقه ســانتریفیوژ شــده، سوپرناتانت آن را جدا کرده و سپس با استفاده از قارچ کش‌ها (بنومیل ، ۱۰ میلی گرم در لیتر و نیســـتاتین، ۲۰۰ واحد در هر میلی لیتر)، قارچهای بی هوازی شسته شدند. محصول بدست آمده به عنوان محیط حاوی باکتری‌های خالص شکمبه استفاده شد (۲۲ و ۴۰).

مراحل جداسازی باکتری پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس از محتویات شکمبه

به منظور جداســازی باکتری پپتواســترپتوکوکوس انئروبیوس از باکتری‌های خالص شکمبه ای، در محیط کشت بایل آ سکولین آزاید آگار[1] (BAAA) ابتدا کشت اولیه در محیط کشت محلول و مغذی که دارای ترکیبات مناسب شامل تریپتیکاز، پکتین، دولسیتول و لاکتات می‌باشد صورت گرفت که پس از طی شدن زمان انکوباتور گذاری در محیط کشت مورد نظر (BAAA) کلنی‌هایی به رنگ قهوه‌ای به قطر ۱ الی ۲ میلی متر ایجاد شــد. با بررســی کلنی‌ها و رنگ آمیزی گرم و مشـــاهدات میکروســـکوپی می‌توان تاییدی بر باکتری مورد نظر که همان پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس است، داشت (۱۴و ۳۰).

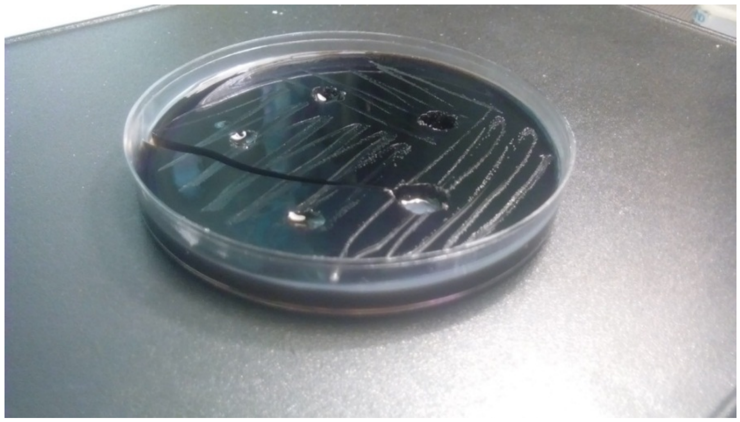
انجام کشت چند خطی[2]

هدف از انجام این کشت رسیدن به کلنی‌های تک و خالص شده باکتری مورد نظر می‌باشد که در طی سه مرحله به صورت موازی و زیگزاگی کشت می‌شوند، به این صورت که ابتدا سوزن آنس را برای اینکه استریل یا ضدعفونی شود روی شعله چراغ گرفته و کلنی مورد نظر را برداشــته و در نهایت به شــکلی کشــت انجام می‌شــود که در قســمتهای دوم و حداکثر ســوم کشــت با کلنی‌های خالص رو به رو گردیم. برای در اختیار داشــتن محیط کشــت مورد نظری که در آن باکتری پپتواســترپتوکوکوس انئروبیوس به خوبی رشــد کرده باشــد و انجام آزمایش مقابله با اســانس، مجدداً در محیط‌های کشــت جامد و مناسب، محیط کشت مایع و نیمه مغذی و مناسب استفاده شد و سپس

1- Bile AesculinAzideAgar

2- Streak Method

محیط‌ها به مدت حداقل ۱۸ وحداکثر ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شـــد و این شـــرایط برای این ایجاد شـــد که باکتری‌ها در فاز فعال و مناسب باقی بمانند (شکل ۱). پس از انکوباتور گذاری محیط کشت را به مدت یک هفته در یخچال می‌توان نگهداری کرد (۲۹).



شکل۱– نمایی از انجام کشت چند خطی باکتری *پپتواسترپتوکوکوس انئربیوس* در محیط کشت BAAA

Figure 1. A view of the streak method used to treat the bacteria *Peptostreptococcusanaerobiu*s in the BAAA culture

جدول ۱– توضیح تیمارهای آزمایشی شامل سطوح مختلف اسانس‌های مرزه و میخک استفاده شده در آزمایش دیسک دیفیوژن

Table1- Statement of experimental treatments include different levels of clove and savory essences used in experiment of disk diffusion

تیمارهای آزمایشی Experimental Treatments	سطوح اسانس (میکرولیتر) Levels of essential oils (µl)		تیمارهای آزمایشی Experimental Treatments	سطوح اسانس (میکرولیتر) Levels of essential oils (µl)	
	مرزه Clove	میخک Savory		مرزه Clove	میخک Savory
T_1	20	-	T_9	20	40
T_2	35	-	T_{10}	35	20
T_3	40	-	T_{11}	35	35
T_4	-	20	T_{12}	35	40
T_5	-	35	T_{13}	40	20
T_6	-	40	T_{14}	40	35
T_7	20	20	T_{15}	40	40
T_8	20	35	T_{16}	Positive control (streptomycin)	

تهیه رقت‌های ســریالی از اســانس ها و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی[1]

در آزمایش حاضـــر از روش دیســـک دیفیوژن[2] جهت غربالگری فعالیت ضد میکروبی ا سانس های مرزه و میخک ا ستفاده شد، بدین صورت که ابتدا از دو ا سانس میخک و مرزه هر کدام با سه رقت ۲۰، ۳۵ و ۴۰ میکرولیتر بر دیســـک به روش فاکتوریل اســـتفاده گردید و تیمارهای آزمایشـــی هر کدام با چهار تکرار مطابق جدول ۱ مورد آزمایش قرار گرفت. روش عمل بدین صـــورت بود که دیســـک‌های تزریق شده توسط اسانس با فاصله معینی روی محیط کشت مورد نظر (BAAA) از باکتری *پپتواســترپتوکوکوس انئروبیوس* قرار داده شـــد. پس از خاتمه کشـــت به مدت ۴۸ ســـاعت در انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا باکتری‌ها به رشد خود ادامه دهند یا توسـط اسـانس‌های مورد نظر از رشـد باز مانند. پس از گذشـت مدت فوق در حا شیه دیسک‌ها منطقه‌ای ایجاد شد که به آن حداقل غلظت بازدارندگی ا سانس یا منطقه تدافعی گفته می شود. بنابراین می‌توان به قدرت بازدارندگی اســـانس‌ها و فعالیت باکتری‌ها پی برد. هر چه قدر این منطقه تدافعی کمتر یا در حد صـــفر باشـــد نشـــان دهنده قدرت باکتری و مقابله آن با ا سانس‌های مرزه ومیخک می‌با شد. همچنین از آنتی بیوتیک اســـترپیتومایســـین (شـاهد مثبت) نیز برای مهار کنندگی باکتری استفاده شد. روش اندازه‌گیری منطقه تدافعی بدین صورت بود

1- Minimum inhibitory concentration (MIC)

2- Disk diffussion

که با استفاده از کولیس بر حسب میلی متر قطر هاله باکتری مورد نظر اندازه گیری و سپس ثبت شد (۲۹).

جدول۲- مقدار تولید گاز تجمعی تیمارهای آزمایشی در ساعات مختلف انکوباسیون (میلی لیتر)

Table 2- The amount of cumulative gas production of experimental treatments in different incubation hours (ml)

تیمارهای آزمایشی[۱] Experimental Treatments[1]	ساعات انکوباسیون Incubation hours								
	2	4	8	16	24	48	72	96	120
مرزه Clove									
0	5.46[b]	14.33[b]	43.25	74.58	88.25	106.08	113.67	114.83	116.25
250	7.54[ab]	15.79[ab]	37.75	65.75	76.33	96.25	106.58	107.79	110.63
500	10.67[a]	19.50[a]	42.29	67.38	78.63	95.63	107.29	108.54	111.88
SEM[2]	1.10	1.40	3.22	4.96	5.73	4.67	4.14	4.13	3.51
میخک Savory									
0	6.83	16.92	48.33[a]	79.75[a]	90.58[a]	107.17	115.83	116.54	118.21
250	8.13	17.04	43.58[a]	70.38[a]	80.71[a]	97.38	106.71	108.38	111.75
500	8.71	15.67	31.50[b]	57.58[b]	71.92[b]	93.42	105.00	106.25	108.79
SEM[3]	3.51	4.13	4.14	4.67	5.73	4.96	3.22	1.40	1.10
مرزه×میخک Savory ×Clove									
0×0	9.75	20.50	51.25	81.25	92.25	111.50	121.25	122.00	123.25
250×0	2.88	12.13	52.63	83.38	94.63	113.88	120.38	122.50	123.25
500×0	3.75	10.38	26.88	59.13	77.88	92.88	99.38	100.00	102.25
0×250	1.75	11.13	45.38	80.63	91.38	106.38	114.13	114.75	117.75
250×250	10.00	18.50	36.25	60.75	69.00	88.75	102.75	104.50	107.38
500×250	11.88	17.75	31.63	55.88	68.63	93.63	102.88	104.13	106.75
0×500	9.00	19.13	48.38	77.38	88.13	103.63	112.13	112.88	113.63
250×250	11.50	20.50	42.50	67.00	78.50	89.50	97.00	98.13	104.63
500×500	11.50	18.88	36.00	57.75	69.25	93.75	112.75	114.63	117.38
SEM[3]	1.90	2.42	5.59	8.56	9.93	8.09	7.17	7.16	6.08
P value									
مرزه Clove	<0.01	0.04	0.45	0.42	0.31	0.23	0.42	0.42	0.50
میخک Savory	0.48	0.74	<0.01	<0.01	0.09	0.12	0.16	0.20	0.17
مرزه×میخک Savory ×Clove	<0.01	0.01	0.42	0.75	0.81	0.48	0.18	0.14	0.10

[a,b] میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

[۱] تیمارهای آزمایشی بر حسب میلی گرم می‌باشند.

[۲] میانگین خطاای استاندارد

[a,b] Means within same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

[1] Experimental treatments based on mg.

[2] Standard Error of Means

جدول۳- فراسنجه‌های تولید گاز در تیمارهای آزمایشی

Table 3- Gas production parameters in experimental treatments

تیمارهای آزمایشی[۱] Experimental Treatments[1]	تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی لیتر به ازای ۰/۲ گرم) b	نرخ تولیدگاز (میلی لیتر در ساعت) c
مرزه Clove		
0	116.39	0.06
250	111.53	0.053
500	111.43	0.056
SEM[2]	3.69	<0.01
میخک Savory		
0	116.99	0.063
250	110.17	0.057
500	112.20	0.049
SEM[3]	3.69	<0.01
مرزه×میخک Savory ×Clove		
0×0	121.97	0.062
250×0	122.88	0.061
500×0	104.33	0.058
0×250	116.33	0.060
250×250	107.75	0.051
500×250	110.51	0.049
0×500	112.67	0.066
250×250	99.89	0.061
500×500	121.74	0.041
SEM[3]	6.38	<0.01
P value		
مرزه Clove	0.56	0.57
میخک Savory	0.42	0.13
مرزه×میخک Savory ×Clove	0.69	0.06

[a,b]میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

[۱]تیمارهای آزمایشی بر حسب میلی گرم می‌باشند.

[۲] میانگین خطاای استاندارد

[a,b] Means within same column with different superscripts differ (P < 0.05).

[1]Experimental treatments based on mg.

[2]Standard Error of Means

تجزیه وتحلیل آماری: داده‌های حاصل از تولید گاز (میلی‌لیتر به ازاء ۰/۲ گرم ماده خشک) به منظور محاسبه ضرایب با استفاده از رویه NLIN در نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) براساس مدل زیر آنالیز شدند.

$$GP=b\,(1-e^{-c\,(t)})$$

که در این معادله GP= حجم گاز تولیدی در زمان t، b= بخشی که در طول زمان گاز تولید می‌کند (کند تجزیه)، c= نرخ تولید گاز (در ساعت) از بخش b در خوراک‌های کند تخمیر و c=زمان انکوباسیون بر حسب ساعت بود.

در پایان داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ با استفاده از رویه آماری GLM با استفاده از مدل زیر مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفتند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ijk}$$

که:

Y_{ijk}= مشاهده مربوط به سطح iام فاکتور A و سطح jام فاکتور B، μ= میانگین کل مشاهدات، A_i=اثر فاکتور i، B_j= اثر فاکتورj، AB_{ij}=اثر متقابل فاکتورiدر فاکتور j و e_{ijk}= خطای تصادفی.

نتایج

مقدار تولید گاز تیمارهای آزمایشی در ساعات مختلف انکوباسیون

در جدول ۲ نشان داده شده است. استفاده از سطح اسانس مرزه ۵۰۰ میلی‌گرم باعث افزایش گاز تولیدی در مقایسه با گروه شاهد در ساعات اولیه (۲ و ۴ ساعت) تخمیر شد (P<۰/۰۵). اما استفاده از میخک در سطح ۵۰۰ میلی گرم باعث کاهش گاز تجمعی تولیدی در ساعات ۸، ۱۶ و ۲۴ در مقایســه با ســطح ۲۵۰ میلی‌گرم و گروه شــاهد شــد (P<۰/۰۵). همچنین اثر متقابل مرزه و میخک در زمان ۲ و ۴ ساعت معنی‌دار بود و باعث افزایش مقدار گاز تولیدی شد (P<۰/۰۵).

فرا سنجه‌های تولید گاز تیمارهای مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است. مقدار تولید گاز (b) و نرخ تولید گاز (c) تحت تأثیر تیمارها یا هر یک از اســانس‌ها قرار نگرفت. با وجود این اثرات متقابل دو اسانس بر پتانسیل گاز تولیدی تمایل به کاهش داشت (P=۰/۰۶).

مقدار ماده آلی قابل هضم، انرژی متابولیسمی و اسیدهای چرب فرار در جدول ۴ نشان داده شده است. سطوح مختلف اسانس مرزه تأثیری بر مقدار ماده آلی قابل هضم، انرژی متابولیسمی و اسیدهای چرب فرار نداشت، اما با افزایش سطح اسانس میخک، مقدار ماده آلی قابل هضم و انرژی متابولیسمی تمایل به کاهش داشت (P=۰/۰۹).

جدول٤– ماده آلی قابل هضم، انرژی متابولیسمیو اسیدهای چرب فرار در تیمارهای آزمایشی

Table 4-Digestible organic matter, Metabolisable energy and Digestible organic matter in experimental treatments

تیمارهای آزمایشی[۱] Experimental Treatments[1]	ماده آلی قابل هضم Digestible organic matter (%)	انرژی متابولیسمی Metabolizable energy (MJ/kg DM)	اسیدهای چرب فرار Volatile free acids (mmol/200 mg DM)
مرزه Clove			
0	14.29	89.67	2.58
250	12.67	81.06	2.45
500	12.99	82.71	2.48
SEM[2]	0.78	4.14	0.08
میخک Savory			
0	14.61	91.35	2.62
250	13.27	84.22	2.48
500	12.08	77.88	2.41
SEM[3]	0.78	4.14	0.08
مرزه×میخک Savory ×Clove			
0×0	92.55	14.83	2.73
250×0	94.27	15.16	2.73
500×0	82.17	12.83	2.27
0×250	91.92	14.72	2.61
250×250	75.76	11.68	2.38
500×250	75.49	11.63	2.37
0×500	89.57	14.28	2.52
250×250	82.62	12.97	2.32
500×500	75.94	11.71	2.60
SEM[3]	7.17	1.35	0.13
P value			
مرزه Clove	0.13	0.31	0.50
میخک Savory	0.09	0.09	0.17
مرزه×میخک Savory ×Clove	0.81	0.81	0.10

[a,b] میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

[۱] تیمارهای آزمایشی بر حسب میلی گرم می¬ باشند.

[۲] میانگین خطاای استاندارد

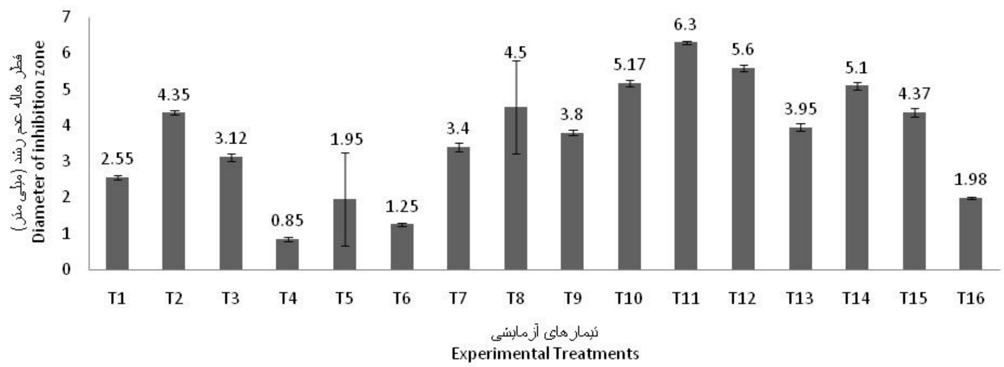
[a,b] Means within same column with different superscripts differ (P < 0.05).

[1] Experimental treatments based on mg.

[2] Standard Error of Means

نتایج حاصل از تاثیر اسانس‌های مرزه و میخک بر قطر هاله عدم رشد باکتری *پپتواستریپتوکوکوس انئرویوس* در شکل ۲ نشان داده شده

است. بر اساس نتایج به دست آمده از روش دیسک دیفیوژن مشاهده شد میزان بازدارندگی از رشد باکتری مزبور در تمامی رقت‌های ذکر شده اسانس‌های مرزه و میخک معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵). همچنین بالاترین رشد قطر هاله باکتری مربوط به تیمار ۱۱ (سطح ۳۵ میکرو لیترا سانس میخک + سطح ۳۵ میکرو لیتر ا سانس مرزه) با میانگین۶/۳ سانتی متر و کمترین رشد قطر هاله باکتری مربوط به تیمار ۴ (سطح ۲۰ میکرولیتر اسانس میخک) با میانگین ۰/۸۵ سانتی‌متر بود (P<۰/۰۵). شکل ۳، تصویر تعدادی از هاله عدم ر شد باکتری *پپتواسترپتوکوکوس انئرویوس* را در غلظت‌های مختلف اسانس مرزه و میخک نشان می‌دهد.



شکل ۲–تاثیر اسانس‌های مرزه و میخک برقطر هاله عدم رشد باکتری *پپتواسترپتوکوکوس انئرویوس*

(T_1-T_{16}، تیمارهای آزمایشی توضیح داده شده در جدول ۱ می باشند.)

Figure 2- Effect of clove and savory essences on diameter of inhibition zone of *Peptostreptococcusanaerobius*

(T_1-T_{16} are experimental treatments stated in Table 1)



شکل ۳–فعالیت ضد میکروبی اسانس های مرزه و میخک با باکتری پپتواسترپتوکوک انئروبیوس در روش کشت چند خطی

Figure 3- Antimicrobial activity of clove and savory essences with *Peptostreptococcusanaerobius in* streak method

همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود در مقایسات گروهی میانگین میزان عدم رشد قطر هاله باکتری *پپتواسترپتو کوکوس انئروبیوس* در بین تیمارهای آزمایشی گزارش شده است.

میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمارهای ۱ تا ۱۵ (سطوح

مختلف تمام اسانس‌های مرزه و میخک) با میانگین ۴/۳۸ سانتی متر در مقایسه با تیمار ۱۶ (استرپتومایسین) با میانگین ۱/۹۸ سانتی متر مشاهده گردید که تمامی تیمارهای حاوی اسانس (ساده و ترکیبی) نسبت به شاهد اثر بازدارندگی رشد را در باکتری مزبور افزایش دادند (P<۰/۰۵). همچنین میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ (سطوح ساده مختلف اسانس مرزه) با میانگین ۳/۳۴ سانتی متر در مقایسه با میانگین قطر هاله باکتری در تیمارهای ۴، ۵ و ۶ (سطوح ساده مختلف اسانس میخک) با میانگین ۱/۳۵ سانتی‌متر نیز نشان داد اسانس مرزه نسبت به اسانس میخک غلظت بازدارندگی بیشتری بر رشد باکتری مزبور داشته است (P<۰/۰۵).

میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمارهای ۱ تا ۶ (سطوح ساده مختلف اسانس‌های مرزه و میخک) با میانگین ۳/۳۴ در مقایسه با قطر هاله باکتری در تیمار ۱۶ (استرپتومایسین) با میانگین ۱/۹۸ سانتی متر مشاهده گردید و بنابراین نشان داد این مقایسه معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵). میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمارهای ۷تا ۱۵ (سطوح مختلف ترکیبی اسانس‌های مرزه و میخک) با میانگین ۴/۶۸ در مقایسه با قطر هاله باکتری در تیمار ۱۶ (استرپتومایسین) با میانگین ۱/۹۸ نیز نشان داد این مقایسه معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵). بنابراین اسانس‌های مرزه و میخک در هر دو صورت ساده و ترکیبی قادرند اثرات بازدارندگی معنی داری بر رشد باکتری *پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس* داشته باشد. همچنین نتایج مقایسه گروهی نشان داد میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمار های حاوی سطوح ترکیبی اسانس های مرزه و میخک (تیمارهای۷ تا ۱۵) با میانگین ۴/۶۸ سانتی متر نسبت به سطوح ساده مختلف اسانس‌های مرزه و میخک (تیمارهای۱تا ۶) با میانگین ۲/۴۳ سانتی متر بیشتر می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول ۵ -مقایسات گروهی برای سطوح متفاوت اسانس‌های مرزه و میخک بر قطر هاله عدم رشد باکتری *پپتواسترپتوکوکوس انئروبیوس*

Table 5- Orthogonal comparison for different levels of clove and savory essences on diameter of inhibition zone of *Peptostreptococcusanaerobius*

متغیرها Parameters	P-value
تمام سطوح مختلف اسانس‌های مرزه و میخک با شاهد (استرپتومایسین) All different levels of clove and savory essences vs. control (streptomycin)	<0.0001
سطوح ساده اسانس مرزه با سطوح ساده اسانس میخک Simple levels of clove essence vs. savory essence	<0.0001
سطوح ساده اسانس مرزه و میخک با شاهد (استرپتومایسین) Simple levels of clove and savory essences vs. control (streptomycin	<0.0001
سطوح ترکیبی اسانس‌های مرزه و میخک باشاهد مثبت (استرپتومایسین) Complex levels of clove and savory essences vs. control (streptomycin)	<0.0001
سطوح ساده اسانس‌های مرزه و میخک با سطوح ترکیبی اسانس‌هایمرزه و میخک Simple levels of clove and savory essences vs. complex levels of clove and savory essences	<0.0001

بحث

در مطالعه حاضر اگرچه اسانس مرزه در ساعت آغازین تخمیر (۲ و ۴ ساعت) و اسانس میخک در ساعات بعدی تا ۲۴ ساعت باعث کاهش گاز تولیدی شدند، اثر متقابل مرزه و میخک در زمان های ۲ و ۴ ساعت باعث افزایش مقدار گاز تولیدی شد (P<۰/۰۵). در مطالعه‌ای (۲۱) اثرات اسانس‌های مختلف بر کاهش گاز تولیدی مخلوط علف یونجه و کنسانتره (با نسبت ۸۰ به ۲۰) را مورد بررسی قرار دادند و علی‌رغم اثر کاهشی تولید گاز توسط دیگر اسانس‌های مورد بررسی، تأثیری از عصاره میخک بر تولید گاز مشاهده نکردند. نتایج مطالعه حاضر این نتایج را تایید می‌کند. نتیجه مشابهی هم توسط گونال و همکاران (۱۸) با استفاده از ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره میخک بر تولید گاز جیره حاوی علف یونجه-سیلاژ ذرت و کنسانتره به نسبت ۵۰:۵۰ گزارش شده است. در مقابل دیگر مطالعات انجام شده با اسانس میخک نشان داده است که استفاده از دزهای افزایشی این اسانس تولید گاز مخلوطی از کاه ارزن و کنسانتره (با نسبت ۸۰ به ۲۰) را کاهش می‌دهد (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر استفاده از دزهای مختلف عصاره‌های گیاهی بر تولید گاز مخلوط ۵۰:۵۰ علف یونجه و کنسانتره مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که عصاره میخک در مقایسه با دیگر اسانس‌های مورد مطالعه توانایی متوسطی از این نظر دارد. در این مطالعه اثر کاهش عصاره میخک بر کاهش گاز تولیدی با افزایش دز خطی بود.

در مطالعه حاضر پتانسیل گاز تولیدی (b) تنها در زمان استفاده همزمان از دو اسانس تمایل به کاهش گاز تولیدی داشت. در گزارشی روفیق و همکاران (۳۴) نشان دادند که استفاده از عصاره میخک به مقدار ۳۰۰ بخش در میلیون تاثیر معنی‌داری بر ضرایب آزمون تولید گاز جیره مخلوط دارای نسبت ۶۰:۴۰ علوفه به کنسانتره نداشت. گزارشی از تاثیر اسانس‌مرزه بر ضرایب تولید گاز توسط نگارندگان یافت نشد.

در خصـــوص اثرات متقابل دو اســـانس میخک و مرزه گزارشـــی توسط نگارندگان یافت نشد. نتایج آزمایش حاضر نشان داد استفاده همزمان از دو اسانس به طور معنی‌داری پتانسیل تولید گاز را کاهش داده و همچنین تمایل به کاهش تولید گاز تجمعی در زمان ۱۲۰ سـاعت و تولید اسـیدهای چرب فرار داشـت. علت کاهش تولید گاز را می توان، افزایش قندهای محلول در واکنش ترکیبی به واســطه افزودن عصـــاره‌های گیاهی بیان کرد (۲۵). همچنین ســـایر محققان، اثرات همکوشـــی یا متضـــاد ترکیبات موجود در اســـانس‌های گیاهی مذکور (تیمول و کارواکرول و اوژنول) را موجب تغییر در تاثیر گذاری اسانس و نتایج حاصله بیان کرده‌اند (۴).

در مطالعه حاضر ماده آلی قابل هضم، انرژی متابولیسمی و تولید اسـیدهای چرب فرار بر اسـاس معادلات ارائه شـده تخمین زده شـد. اســتفاده از اســانس میخک تمایل به کاهش ماده آلی قابل هضــم و انرژی متابولیسمی داشت اما تأثیری بر اسیدهای چرب فرار نداشت. در تضاد با این نتایج، روفیق و همکاران (۳۴) نشان دادند که استفاده از عصــــاره میخک در غلظت ۳۰۰ بخش در میلیون تاثیری بر انرژی متابولیسمی تخمین زده شده در آزمایش تولید گاز نداشت. در مطالعه حاضــر مقدار اســانس مورد اســتفاده بیشــتر از این مقدار بود (تا ۵۰۰ بخش در میلیون).

گونال و همکاران (۱۰) نیز نشـــان دادند که اســـتفاده از عصـــاره میخک اگرچه تأثیری بر تولید اسیدهای چرب فرار نداشت با این حال باعث کاهش قابلیت هضــم ماده خشــک شــد. با وجود این پاترا و یو (۳۲) کاهش اسـیدهای چرب فرار و قابلیت هضـم ماده خشـک را با استفاده از اسانس میخک نشان دادند. کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و کاهش قابلیت هضـم واقعی ماده خشـک با اسـتفاده از عصـاره میخک در آزمایشـات قبلی نیز گزارش شـده اسـت (۱۰). در تضـاد با نتایج حاضر،کاستیلجئوس و همکاران (۹) نشان دادند که استفاده از عصاره مرزه تا غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از محیط کشت به مدت ۲۴ سـاعت باعث افزایش تولید اسـیدهای چرب جیره حاوی علوفه و کنسانتره با نسبت ۱۰ به ۹۰ شد.

کاهش ناپدید شدن ماده خشک با استفاده از عصاره میخک توسط جهانی عزیزآبادی و همکاران (۱۲) گزارش شـــده بود. با وجود این در مطالعه‌ای روی و همکاران (۳۵) نشان دادند که دزهای بیشتر از ۳۰۰ بخش در میلیون عصـــاره میخک در جیره‌ای که دارای نســـبت برابر کنســانتره و علوفه اســت باعث کاهش تولید گاز، هضــم حقیقی ماده خشک و ماده آلی در آزمایش تولید گاز می شود. در تضاد با این نتایج و نتایج مطالعه حاضـر، کاسـتیلجئوسـو همکاران (۹) نشـان دادند که استفاده از عصاره میخک در جیره‌ای با نسبت کنسانتره به علوفه ۹۰ به ۱۰ باعث افزایش غلظت کل اسـیدهای چرب فرار به مقدار ۵۲/۳–۳۲/۸ درصد می‌شود.

ریقی و همکاران (۳۳) با بررســـی اســـتفاده از ماده موثره مرزه (کارواکرول) به مقدار ۰/۵ میلی گرم در لیتر از محیط کشت، تاثیری از این ماده بر قابلیت هضم ماده خشک و دیواره سلولی حاوی همی‌سلولز علف یونجه، دانه ذرت، کنجاله ســویا و جیره مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاهی مشاهده نکردند.

داده‌های اندکی در خصوص اثرات متقابل استفاده از اسانس‌های گیاهی و همچنین اثرات اسانس مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری منتشر شده است. روفیق و همکاران (۳۴) اثرات همپوشانی مثبت بین اسانس میخک و دارچین را در کاهش متان تولیدی در آزمایشـــات برون تنی نشان دادند.

علت تناقض و تفاوت در نتایج بدسـت آمده از آزمایشـات مختلف در خصـوص اثرات اسـانس بر تخمیر و تغییر فراسـنجه‌های تخمیری می‌تواند به دلایل مختلفی باشد که مهمترین آن روش عصاره‌گیری و نوع جیره آزمایشـــی (نســـبت علوفه به کنســـانتره) اســـت. طلاتپه و همکاران (۳۸) نشـــان دادند که اثر متقابل جیره و اســـانس مرزه بر افزایش وزن بزغاله‌های بومی آذربایجان معنی دار اســـت. ماتئوس و همکاران (۲۳) تاثیر استفاده از اسانس‌های دارچین و سیر را بر روی جیره‌های دارای کنسانتره متوسط و زیاد مقایسه نمودند و نشان دادند که نوع جیره دارای اثر متقابل معنی‌دار با اســـانس‌های بکار رفته بر تولید گاز و نســبت اســیدهای چرب تولیدی دارد. همچنین کاردوزو و همکاران (۸) نشـــان دادند که مقدار pH محیط کشـــت حاوی مایع شکمبه در شرایط برون تنی می‌تواند دارای اثر متقابل بر پاسخ حاصل از اسانس‌های گیاهی مورد استفاده داشته باشد.

در آزمایش حاضر، کمترین اثر ضد میکروبی، مربوط به سطح ۲۰ میکرولیتر اســـانس میخک و بیشـــترین اثر ضـــد میکروبی، مربوط به ترکیب ۳۵ میکرولیتر از هر کدام از اســـانس‌های میخک و مرزه بوده است. بنابراین اثر ضد میکروبی اسانس‌های مرزه و میخک با سطح ۳۵ میکرولیتر افزایش یافته است. همچنین نتایج حاصل از آزمایشات کشـــت میکروبی باکتری تولید کننده آمونیاک (*پپتواســـترپتوکوکوس انئروبیوس*) نیز نشـــان داد تمامی تیمارهای حاوی اســـانس (ســـاده و ترکیبی) نسبت به شاهد، تیمارهای حاوی اسانس مرزه نسبت به شاهد و ســـطوح ترکیبی اســـانس‌های مزبور نســـبت به ســـطوح ســـاده اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد این باکتری داشته است ($P<0/05$). لذا اثر ممانعت کنندگی اسانسهای مرزه و میخک بر روی این باکتری نشان داد که اســـتفاده از اســـانس‌های مرزه و میخک در این تیمارها باعث می‌شود که تولید آمونیاک احتمالا کاهش یابد.

در تحقیقات نشان داده شده است که اسانس‌ها با کاهش جمعیت باکتری و تک یاخته‌های تولید کننده آمونیاک شکمبه به میزان فراوان سـبب کاهش نیتروژن آمونیاکی مایع شـکمبه می‌شـوند (۳۹). کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در جیره‌های حاوی آویشـــن شـــیرازی که ترکیباتی مشـــابه به مرزه و میخک دارد می‌تواند با اثر فعالیت ضـــد میکروبی این اسـانس بر باکتری‌های گرم مثبت و باکتری تولید کننده

مقدار بالای نیتروژن امونیاکی ارتباط داشته باشد (۲).

در سـایر پژوهش‌ها نیز گزارش شـده اسـت که افزودن گیاهان دارویی در شـرایط مطلوب، موجب کاهش غلظت آمونیاک موجود در شیرابه شکمبه می شود. شرایط مطلوب از این حیث مطرح ا ست که فاکتورهایی مانند ترکیب شـیمیایی و دوز مصـرف ترکیبات فعال می‌تواند بر متابولیسم نیتروژن در شکمبه اثر گذار باشد. ترکیبات موثر متفاوت، آ ثار متفاوتی بر متابولیسـم نیتروژن دارد (۵). طلا تپه و همکاران (۳۸) نیز نشان دادند که افزودن سطح ۲۰۰ میلی گرم اسانس مرزه باعث کاهش معنی داری در غلظت نیتروژن آمونیاکی شـکمبه بزغاله‌ها شـد، بطوری که بیشـترین مقدار مربوط به سـطح ۲۰۰ میلی گرم اسـانس مرزه بود. مک اینتاش و همکاران (۲۵) گزارش دادند که مخلوطی از اسانسهای گیاهی می‌تواند رشد سویه‌هایی از باکتری‌هایی که مقدار زیادی نیتروژن آمونیاکی تولید می کنند (مانند کلسـتریدیوم اسـتیکلاندی و پپتواسـترپتوکوکوس انئروبیوس) را محدود کرده، در حالی که همزمان تاثیری بر رشد برخی دیگر از باکتری‌های این دسته نظیر کلستریدیوم آمینوفیلوم ایجاد نمی کنند. انتقال ا سیدهای آمینه به درون سلول باکتری از طریق نیروی محرک پروتون- سدیم صورت می‌گیرد (۱۱) یکی از سـازو کارهای پیشـنهاد شـده برای عمل کارواکرول و تیمول، آسیب به غشاء سلول باکتری و اختلال در کارکرد نیروی محرک پروتون–سـدیم[۱] می باشـد که باعث از بین رفتن باکتریهای تولید کننده آمونیاک می‌شود (۴). باسکویت و همکاران (۵) نشـان داده‌اند که برخی از اسـانس‌ها (اسـانس رازیانه، روغن کادتی، ا سانس فلفل سبز، ا سانس دارچین، ا سانس دارچین، ا سانس میخک، اسانس مرزه، اسانس پونه، اسانس شوید، اسانس سیر، اسانس زنجبیل و روغن درخت چای) و ترکیبات اصـلی آنها (انتول، سـیلیکات، کارواکرول، تیمول، اوژینول و کاروون) در مقادیر بالا(۳۰۰۰میلی گرم بر لیتر) غلظت نیتروژن آمونیاکی را شدیدا کاهش دادند ولی این نتیجه در مقادیر متوسـط (۳۰۰ میلی گرم در لیتر) کمتر و در مقادیر کمتر (۳ میلی گرم در لیتر) مشاهده نشد.

کاهش غلظت آمونیاک در تیمارهای حاوی برخی از گیاهان دارویی در مقایسـه با خوراک پایه ممکن اسـت به دلیل مهار باکتری‌های تجزیه کننده پروتئین توسط مواد موثره موجود در گیاهان دارویی و در نتیجه کاهش تجزیه پروتئین در شـکمبه باشـد و یا اثر منفی موادموثر موجود در گیاهان دارویی بر باکتری‌های تولید کننده آمونیاک با توان بالا باشد که موجب کاهش تولید آمونیاک در شکمبه می‌شـود. همچنین کاهش پروتوزآ و کاهش بلعیده شـدن باکتری‌ها توسط آنها نیز می‌تواند از دیگر دلایل کاهش آمونیاک باشد(۵).

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این آزمایش نشـان داد که اسـتفاده از اسـانس میخک باعث کاهش تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری شد اما اسانس مرزه تأثیری بر مقدار تولید گاز، قابلیت هضـم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و مقدار ا سیدهای چرب فرار ندا شت. در این مطالعه وجود این اثرات همکو شی ا ستفاده همزمان از دو ا سانس مرزه و میخک بر کاهش تولید گاز مشاهده شد و در نتیجه اثرات همکوشی اسانس‌ها در مطالعات باید مورد توجه قرار گیرد. بنابراین برای مطالعات بعدی پیشنهاد می شود تأثیر ا سانس‌ها به همراه منابع مختلف انرژی همانند پکتین، نشاسته و منابع مختلف پروتئینی در شرایط برون تنی و درون تنی مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین توجه به تغییرات دیگر تولیدات تخمیری همانند نیتروژن آمونیاکی، متان و ترکیب جمعیت میکروبی در این آزمایشات نیز می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد.

منابع

1. Akhtar, M. S., B. Degaga, and T. Azam. 2014. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review, Biological Sciences and Pharmaceutical Research, 2 (1): 1–7.
2. Benchaar, C., S. Calsamiglia, A. V. Chaves, G. R. Fraser, D. Colombatto, T.A. McAllister, and K.A. Beauchemin. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Animal Feed Science and Technology, 145:209-228.
3. Bromand, M. A., M. Sharifi, Gh. Irajan, F. shahcheraghi, B. Valizadeh, M. Rahbar, F. Fllah, F. RashedMarandi, and M. Sarmi. 2012. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seda, Tehran, Iran (In Persian).
4. Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.
5. Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science, 89: 761-771.
6. Calsamiglia, S., L. Castillejos, and M. Busquet. 2006. Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle.Pages 129–167 in Recent Advances in Animal Nutrition. P. C. Garnsworthy, and J. Wiseman, ed. Nottingham University

۱- Proton–sodium motive force

Press, Nottingham, UK.

7. Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. Journal of Dairy Science, 90:2580–2595.
8. Cardozo, P.W., S. Calsamiglia , A. Ferret, and C. Kamel. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. Journal of Animal Science, 83:2572–2579.
9. Castillejos, L., S. Calsamiglia, J. Martín-Tereso, and H. TerWijlen. 2008. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. Animal Feed Science and Technology, 145:259-270.
10. Chandrasekharaiah, M., A. Thulasi, and L. Jose. 2015. Effect of Supplementation of Different Essential Oils on in-Vitro Methanogenesis, Fermentation and Digestibility of Finger millet straw based Diet in Rumen Liquor of Crossbred Cattle. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6 (2): 480-486.
11. Chen, G., C. J. Sniffen, and J. B. Russell. 1987. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: Effects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency. Journal of Dairy Science. 70:983–992.
12. Dorman, H J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88: 308-316.
13. Dehority, B.A. 2003. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
14. Eschenlauer, S.C. P., N. Mckain, N. D. Walker, N. R. McEwan, C. J. Newbold, and R. J. Wallace . 2002. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen .Applied Environmental Microbiology, 68: 4925-4931.
15. Gershenzon, J., and R. Croteau. 1991. Terpenoids. Pages 165–219 in Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites. Vol. 1.G. A. Rosenthal, and M. R. Berenbaum, ed. Academic Press, San Diego, CA.
16. Getachew, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. Journal of Agricultural Science, 139(3): 341-352.
17. Griffin, S.G., S.G. Wyllie, J.L. Markham, and D.N. Leach. 1999.The role of structure and molecular properties of terpernoids in determining their antimicrobial activity. Flavour and Fragrance Journal, 14: 322-332.
18. Günal, M., B. Pinski, and A. A. AbuGhazaleh. 2017. Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under in vitro conditions. Italian Journal of Animal Science, 16(3): 500-506.
19. Halimi Shabestari, A., R. Salamat doustnobar, and N. Maheri-Sis. 2011. Evaluation Effects of Clove Methanol Extract on Methane Production in the in vitro Condition. Pakistan Journal of Nutrition, 10 (12): 1154-1157.
20. Hart, K. J., D. R. Yanez-Ruiz, S. M. Duval, N. R. McEwan, and C. J. Newbold. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology, 147: 8-35.
21. Jahani-Azizabadi, H., M. DaneshMesgaran, A. R. Vakili, and K. Rezayazdi. 2014. Effect of some plant essential oils on *in vitro* ruminal methane production and on fermentation characteristics of a mid-forage diet. Journal of Agricultural Science and Technology, 16: 1543-1554.
22. Lee, S. S., J. K. Ha, and K. J. Cheng. 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls and their interactions. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3807 – 3813.
23. Macheboeuf, D., D.P.Morgavi, Y.Papon, J.L.Mousset, M.Arturo-Schaan. 2008. Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. Animal Feed Science and Technollogy, 145: 335–350.
24. Mateos, I., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, C. Kemal, and M. D. Carro. 2013. The influence of diet type (dairy versus intensive fattening) on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate in vitro ruminal fermentation and methane production.Animal Production Science, 53: 299-307.
25. McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, and C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. Applied and Environmental Microbiology, 69:5011–5014.
26. Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and gas production using rumen fluid. Animal Research Development, 28(3): 7-55.
27. Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor*in vitro*.Journal of Agricultural Science, 92: 217–222.
28. Momeni, T. K., and N. Shahrokhi. 1998. Essential oils and their therapeutic actions. Tehran University Press (In Persian).

29. Moree, L.V., J. L. Johnson, and W. E. C. Moree.1986. Genus Peptococcus Kluyver and Van Neil 1936, 400AL , pages 1082-1083, and Genus Peptostreptococcus Kluyver and Van Neil , pages 1083-1092 in Bergey,s manual of systematic bacteriology. P. H. Sneath, N. S. Mair, E. M. Sharpe, and J G. Holt, ed. The Williams & Williams CO., Baltiore.
30. Paster, B. J., J. B. Russell, C. M. J. Yang, J. M. Chow, C. R. Woese, and R. Tanner. 1993. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria Peptostreptococcusanaerobius, Clostridium sticklandii and Clostridiumaminophilumsp. International Journal Systematic Bacteriology, 43:107–110.
31. Patra, A. K. 2011.Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 6(5): 416-428.
32. Patra, A.K., and Z. Yu. 2012. Effects of essential oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations. Applied Environmental Microbiology, 78: 4271–4280.
33. Righi, F., M. Simoni, A. Foskolos, V. Beretti, A. Sabbioni, and A. Quarantelli. 2017. In vitro ruminal dry matter and neutral detergent fiber digestibility of common feedstuffs as affected by the addition of essential oils and their active compounds. Journal of Animal and Feed Sciences, 26: 204–212.
34. Rofiq, M. N., S. Martono, M. Görgülü, and M. Boga. 2012. Combination Effect of Clove and Cinnamon Oil on in Vitro Rumen Gas and Methane Production. Proceeding of the 2nd International Seminar on Animal Industry, Jakarta, 431-437.
35. Roy, D., S. K. Tomar, S. K. Sirohi, V. Kumar, and M. Kumar. 2014. Efficacy of different essential oils in modulating rumen fermentation in vitro using buffalo rumen liquor. Veterinary World, 7: 213-218.
36. Russell, J. B., H. J. Strobel, and G. Chen. 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. Applied and Environmental Microbiology, 54: 872-877.
37. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.0 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
38. Talatapeh, A., P. Farhoomand, Y. A. Alijoo, M. Ghaderzadeh, and E. Norouzi. 2013. Effects of Summer Savory essential oil with two types of diets on performance, rumen fermentation and blood parameters of West Azerbaijan native kids. Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi), 102: 71-80 (In Persian).
39. Wallace, R. J., N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne, and C. J. Newbold. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 10: 1458–1468.
40. Zhang, Y., W. Gao, and Q. Meng. 2007. Fermentation of plant cell walls by ruminal bacteria, protozoa and fungi and their interaction with fiber particle size. Archives of Animal Nutrition, 61(2): 114–125.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 3, Fall2021, p. 335-349

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰،ص. ۳۴۹-۳۳۵

Different levels of clove and savory essences on fermentative parameters in gas production technique and their antimicrobial effects on *Peptostreptococcusanaerobius* bacteria isolated from rumen

Hojat Imani Moghadam[1], Samaneh Ghasemi[2], Saeid Sobhanirad[3*], Mehdi Behgar[4]

Submitted: 27-06-2018
Accepted: 04-11-2020

Imani Moghadam, H., S. Ghasemi, S. Sobhanirad, and M. Behgar. 2021. Different levels of clove and savory essences on fermentative parameters in gas production technique and their antimicrobial effects on *Peptostreptococcus anaerobius* bacteria isolated from rumen. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3): 335-349.

Introduction Since the legislation of European Union has prohibited the use of growth-promoting antibiotics such as monensin, scientists have been interested in alternatives to manipulate rumen fermentation. The use of growth-promoting antibiotics in animal feeds is banned in Europe due to potential risks such as the spread of antibiotic resistance genes or the contamination of milk or meat with antibiotic residues. Recently, essential oils have been increasingly evaluated to replace or facilitate reductions in the use of antibiotics. The most effects of plant essential oils, especially cloves and savory oils, are their antioxidant effects and their effects on the metabolism of ruminal microbes. The antiprotozoal effects of clove extract have been proven in the studies in vitro by gas production technique. Few studies have been done on the effects of clove oil, especially the savory oil, on the digestive properties in the country. Also, no study was found on the interactions of these essential oils in the experiments in vitro. Thus, the aim of this study was investigated to evaluate the effects of clove and savory oils on gas production and in vitro fermentation process and estimation of gas production parameters of feedstuffs (alfalfa hay and barley grain).

Materials and Methods Experimental treatments were included control (basal feeds without additive), basal feeds supplemented with three levels of clove oil (0, 250, 500 mg) and three levels of savory oil (0, 250, 500 mg) per kg of DM in a rumen culture. Ruminal fluid was collected from two fistulated sheep (49.5±2.5 kg). All samples isolated from the rumen were withdrawn 2 h after the morning ration had been consumed. Collected rumen contents were strained through four layers of cheesecloth and brought immediately to the laboratory. Gas production technique was used to detect the fermentation parameters of the treatments. About 200 mg of basal diet (alfalfa hay and barley grain, 1:1, with clove and savory oils) were incubated in 100ml glass syringes and 30ml of incubation liquid were added and were incubated in 39 C° water bath. The gas production was measured in 2, 4, 6, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120h. Three parallel syringes of each treatment were prepared in this experiment in a completely randomized design in a factorial arrangement. They were used to measure the gas production parameters (fermentable fraction (b) and rate (c) of gas production) cumulative gas production, organic digestibility and metabolizable energy of treatments until 120 h. In the present study, digestible organic matter, metabolizable energy, and production of volatile fatty acids were estimated based on the presented equations.In the second experiment, Peptostreptococcus anaerobic was isolated from the ruminal fluid, cultured in the medium of BAAA **(**Bile EsculinAzideAgar**)**, and evaluated by different levels of cloves and fennel essences in a randomized complete design with sixteen treatments and three replicates using Duncan test at level 0.05. Experimental levels in this experiment including: 20, 35 and 40 µl of cloves essence, 20, 35 and 40

1- M.Sc. Graduate, Department of Agricultural Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2- Assistant professor, Department of Agriculture, Faculty of Shahryar, Tehran branch, Technical and Vocational University, Tehran
3- Assistant professor, Department of Agricultural Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
4- Associated professor, Nuclear Science & Technology Research Institute, Karaj, Iran.
(*- Corresponding author email: sobhanirad@gmail.com)
DOI:10.22067/ijasr.v13i3.73987

µl of fennel essence, 20 µl of fennel essence + 20 µl of cloves essence, 20 µl of fennel essence + 35 µl of cloves essence, 20 µl of fennel essence + 40 µl of cloves essence, 35 µl of fennel essence + 20 µl of cloves essence, 35 µl of fennel essence + 350 µl of cloves essence, 35 µl of fennel essence + 40 µl of cloves essence, 40 µl of fennel essence + 20 µl of cloves essence, 40 µl of fennel essence + 35 µl of cloves essence, 40 µl of fennel essence + 40 µl of cloves essence, control.Statistical analysis of data was performed by SAS statistical software (9.1 version). Duncan's multiple test range was conducted in level 5%.

Results and Discussion High levels of savory oil were increased gas production in the first hours ($p<0.05$), but clove oil was reduced gas production in 8-24 hours ($p<0.05$). Although, few data have been published on the interaction effects of the use of the essential oils, as well as on the effects of savory oil on fermentation parameters. The amount of gas production (b) tend to be decreased ($P=0.06$) due to the simultaneous use of savory and clove oils. Different levels of savory oil had no effect on estimated organic matter digestibility, metabolizable energy, and volatile fatty acids. But, with increasing the levels of clove oil, the amount of estimated organic matter digestibility, metabolizable energy tend to be decreased ($P=0.09$). In the microbial experiment, after incubation of peptostreptococcus anaerobic in medium of Bile AesculinAzideAgar and adding different levels of cloves and fennel essences was observed that all levels of treatments were significant ($P<0.05$); the highest growth of bacteria was related to treatment 11 (35 µl of fennel essence + 350 µl of cloves essence). This result showed ammonia-producing bacteria known peptostreptococcus anaerobic is inhibiting by different levels of clove and savory essences and finally resulting in the decrease of rumen fluid Ammonia nitrogen.

Conclusion According to our results we can conclude thatusing savory oil improves ruminal fermentation in vitro and with increasing the levels of savory oil, the amount of gas production, the organic matter digestibility, the metabolizable energy and volatile fatty acidsconcentration were decreased. Also in this study, were shown the co-effects of simultaneous use of savory and clove oils on the reduction of gas production. Therefore the effects of essential oils should be considered. For further studies, it is suggested that the effect of essential oils along with various sources of energy, such as pectin, starch, and various protein sources, should be studied in vitro and in vivo. Also, consideration of other changes in fermentation products such as ammonia nitrogen, methane and the composition of the microbial population in these experiments can also be of particular importance.

Key words: clove oil, savory oil, gas production, volatile fatty acid, Peptostreptococcus anaerobic.